

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-167824

(43) 公開日 平成7年(1995)7月4日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 27/327				
27/416				
33/18	1 0 5	7055-2 J		
G 0 1 N 27/ 30			3 5 5	
27/ 46			3 0 1 N	
審査請求	未請求	請求項の数9	OL	(全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平6-202134

(22) 出願日 平成6年(1994)8月26日

(31) 優先権主張番号 特願平5-211954

(32) 優先日 平5(1993)8月26日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000145541

株式会社曙ブレーキ中央技術研究所  
埼玉県羽生市東5丁目4番71号

(71) 出願人 591086706

軽部 征夫  
神奈川県川崎市宮前区東有馬1丁目3番地  
16

(72) 発明者 軽部 征夫

神奈川県川崎市宮前区東有馬1-3-16

(72) 発明者 矢野 清子

埼玉県羽生市東5丁目4番71号株式会社曙  
ブレーキ中央技術研究所内

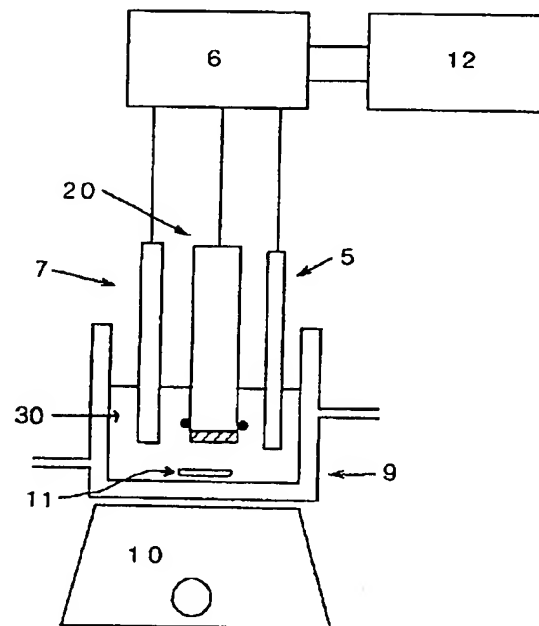
(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 BODセンサ及びBODの測定方法

(57) 【要約】

【目的】 酸素電極を用いずに直接に有機化合物濃度を測定することができ、溶存酸素量が低くても測定が可能なBODセンサを提供する。

【構成】 有機物を含有する溶液に、金属又は炭素からなる電極並びにこの電極に当接された微生物菌体を含む薄膜からなる作用電極と対極と、必要に応じて参照電極を浸漬し、作用電極と対極若しくは参照電極との間に電位差を負荷したときに両電極間に流れる電流を計測することにより、この溶液のBODを測定する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 金属又は炭素からなる電極並びにこの電極に当接された微生物菌体を含有する薄膜からなる微生物電極と、対極とを有するBODセンサ。

【請求項2】 さらに参照電極を有する請求項1記載のBODセンサ。

【請求項3】 前記微生物が前核生物であることを特徴とする請求項1又は2記載のBODセンサ。

【請求項4】 有機物を含有する溶液に、金属又は炭素からなる電極並びにこの電極に当接された微生物菌体を含む薄膜からなる作用電極と対極とを浸漬し、作用電極と対極との間に電位差を負荷したときに両電極間に流れる電流を計測することにより、この溶液のBODを測定する方法。

【請求項5】 請求項4において、前記溶液にさらに参照電極を浸漬し、作用電極と参照電極との間に電位差を負荷したときに両電極間に流れる電流を計測することにより、この溶液のBODを測定する方法。

【請求項6】 前記微生物が前核生物であることを特徴とする請求項4又は5に記載のBODを測定する方法。

【請求項7】 前記有機物を含有する溶液及び／又は微生物膜にメディエータを添加することを特徴とする請求項4～6のいずれか一項に記載のBODを測定する方法。

【請求項8】 前記メディエータが、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルスルフォネート、2,6-ジクロロインドフェノール及びフェリシアン化カリウム、からなる群から選ばれることを特徴とする請求項6記載のBODを測定する方法。

【請求項9】 前記メディエータが、10nm以上の濃度範囲で添加されることを特徴とする請求項7記載のBODを測定する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、BODセンサに関し、詳しくは、酸素電極を用いないBODセンサに関する。

## 【0002】

【従来の技術】河川や産業排水の水質管理に重要な項目として、BOD（生物化学的酸素要求量）があり、国際的な有機性水質汚濁の指標とされている。有機化合物に起因する水質汚濁は、好気性微生物による酸化反応で減少、消去され、その有機物質濃度に対応して溶存酸素が消費される。この消費された酸素量を計測することで、水質汚濁が明らかになる。すなわちBODは、有機化合物濃度を、酸素量により間接的に表したものである。

【0003】日本工業規格JISでBODの測定法が規定されているが、この方法は煩雑な操作を必要とし、さらに測定に5日間を要するなどの問題点があった。そこで迅速、簡単、かつオンライン計測可能なBOD測定法が要望され、既にBODセンサが開発されており、工場

排水などの測定に利用されている。

【0004】従来使用されているBODセンサは、微生物膜と酸素電極で構成されており、溶液中の溶存酸素の減少量によりBODを測定するものである。このようなセンサとして、例えば、酸素電極の隔膜とそれを覆う透析膜の間に有機物を資化し酸素を消費する微生物を封入せしめた微生物電極（特開昭54-47699号公報）が知られている。

【0005】しかしながら、上記のような溶存酸素の減少量によりBODを測定するセンサでは、溶存酸素の低い廃液では正確な値を測定することは難しいという問題がある。また、酸素電極の構造は、電極内に電解液等を内蔵するために、ある程度の大きさが必要であった。

## 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記観点からなされたものであり、酸素電極を用いずに直接に有機化合物濃度を測定することができ、溶存酸素量が低くても測定が可能なBODセンサを提供することを課題とする。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために、BODセンサを以下の構成とした。すなわち本発明は、金属又は炭素からなる電極並びにこの電極に当接された微生物菌体を含有する薄膜からなる作用電極（微生物電極）と、対極とを有するBODセンサである。また本発明は、有機物を含有する溶液に、金属又は炭素からなる電極並びにこの電極に当接された微生物菌体を含有する薄膜からなる作用電極（微生物電極）と、対極とを有するセンサを浸漬し、微生物電極と対極との間に電位差を負荷したときに流れる電流を計測することにより、この溶液のBODを測定する方法を提供する。

【0008】また本発明は、上記構成に加えてさらに参照電極を有するBODセンサ、及び有機物を含有する溶液に、このBODセンサを浸漬し、作用電極と参照電極との間に電位差を負荷したときに流れる電流を計測することにより、この溶液のBODを測定する方法を提供する以下、本発明を詳細に説明する。

## 【0009】＜1＞本発明のBODセンサ

本発明のBODセンサは、金属又は炭素からなる電極（以下、単に「金属電極」ともいう）並びにこの金属電極に当接された微生物菌体を含む薄膜（以下、単に「微生物膜」ともいう）からなる作用電極と、対極とを有する。本発明の他の態様のBODセンサは、金属電極並びにこの金属電極に当接された微生物菌体を含む薄膜（以下、単に「微生物膜」ともいう）からなる作用電極と、対極と、さらに参照電極とを有する。

【0010】微生物を有機化合物を含む試料溶液に存在させると、微生物は有機化合物をエネルギー獲得のために代謝する。その過程において、呼吸鎖の電子伝達系に

電子の移動が起こる。この際、代謝される有機物濃度と移動する電子の量には相関がある。したがって、この移動する電子の量を測定することによって微生物のまわりに存在する有機物濃度がわかり、BODを測定することができる。この電子の移動量を直接計測することは困難であるので、本発明においては、上記構成を有するBODセンサを有機化合物含有溶液に浸漬し、センサの作用電極と対極もしくは参照電極との間に、電子が移動しやすいように一定の電位差を負荷し、両電極間に流れる電流を計測する。以下に、本発明のBODセンサの構成を説明する。

【0011】微生物膜は、微生物菌体を金属電極表面又はその近傍に存在させるためのものであり、薄膜状のものであれば、特に形態は問わない。例えば、微生物菌体を、アルギン酸ゲル膜、アガロースゲル膜、光架橋性ポリビニルアルコール膜あるいはポリアクリルアミド膜等の三次元架橋構造体中に封入したものが挙げられる。金属電極と透析膜等の微生物菌体を透過させない膜との間に微生物を膜状に封入してもよい。また、高分子膜に微生物菌体を固定してもよい。さらには、作用電極を構成する金属膜表面に、グルタルアルデヒド等を用いて微生物を膜状に固定化したものでもよい。薄膜中の微生物は生存していることが望ましい。

【0012】上記微生物としては、有機物を代謝することにより電子伝達系に電子の移動が起こるものであればよく、特に制限されない。前核微生物及び真核微生物のいずれも使用できるが、真核生物細胞内では呼吸鎖の電子伝達がミトコンドリア内で行われるため、作用電極に移動する電子の量が比較的小さいので、BOD測定感度の点では前核微生物が好ましい。前核微生物としては、例えば、大腸菌、バチルス属、アシネトバクター属、グルコノバクター属あるいはシュードモナス属に属する細菌、放線菌などの前核微生物が、真核微生物としてはトリコスポロン属に属する酵母等が挙げられる。

【0013】金属又は炭素からなる電極は、BOD測定試料中の有機物が微生物により代謝されて生じる電子を受け取る。作用電極の素材としては、安定であり、かつ、導電性が大きく、微生物に実質的に無害なものであればよく、例えば、白金、金、銀等の金属、又はグラファイト、カーボン等の炭素素材が挙げられる。また、その形状としては、特に制限はないが、棒状、筒状、シート状が挙げられる。

【0014】本発明のBODセンサを構成する作用電極は、上記金属電極に微生物膜を当接させたものである。金属電極と微生物膜との距離が離れすぎると、微生物膜で生じた電子が金属電極に移動することができない。この意味で、「当接」とは必ずしも完全に接している必要はなく、溶液中で電子が移動可能な程度に近接していればよい。

【0015】上記作用電極の具体的構造としては、金属

電極表面上に官能基を介して微生物を固定したもの、微生物を含むゲル膜を金属電極に接着したもの、金属電極端に透析膜を被せ、金属電極と透析膜の間に微生物を入れたものなどが挙げられる。また、微生物懸濁液をアセチルセルロース等の薄膜上で吸引濾過し、この薄膜上に微生物を膜状に集菌し、アセチルセルロース膜の外側から透析膜で覆うようにして金属電極に被せてもよい。また、金属電極の形状及び微生物膜の形状は、これらの接触面積が大きくなるようにするとよい。

【0016】本発明のBODセンサは、上記作用電極と対極とを有し、必要に応じてさらに参照電極を有する。対極の素材としては、白金、銀、金、カーボン等が挙げられる。BODセンサを測定試料液に浸漬し、作用電極と対極との間に電位差を負荷したときに、電極反応が進行するにつれて、電極表面での反応種の濃度は減少し、また生成物の濃度が増加するなどして電極電位が設定した電位からずれてしまうことがある。そこで、Ag/AgCl電極等の参照電極を試料液に浸漬し、参照電極を電位設定の基準として作用電極の電位を設定することが好ましい（3極法）。

【0017】本発明のBODセンサは、作用電極と対極及び必要に応じて参照電極とを別体としてもよいし、また一体構造としてもよい。

【0018】＜2＞BODの測定法

本発明のBODの測定法は、有機物を含有する溶液（測定試料液）に上記BODセンサを浸漬し、作用電極と対極もしくは参照電極との間に電位差を負荷したときに両電極間に流れる電流を計測することにより、この溶液のBODを測定する方法である。

【0019】具体的には、例えば、上記BODセンサを測定試料液に浸漬し、作用電極と対極との間に電位差を負荷し、両電極間に流れる電流を計測する。また、3極法においては、作用電極と参照電極との間に電位差を負荷し、両電極間に流れる電流を計測する。電位差の負荷及び電流の測定は、ポテンシオスタット等を用いるとよい。

【0020】また、試料液にメディエータを添加しておくと、より高感度な測定が可能となるので好ましい。あるいは、微生物膜中又は微生物膜と金属電極との間にメディエータを含ませてもよい。

【0021】メディエータは、微生物により有機物が代謝されて生じる電子が、金属電極に移行するのを促進するものである。メディエータとしては、微生物から金属電極に電子が移行するのを促進するものであればよく、具体的には1-メトキシ-5-メチルフェナジニウムメチルスルフォネート（1-M-PMS）、2,6-ジクロロインドフェノール（DCIP）、9-ジメチルアミノベンゾ- $\alpha$ -フェナソキソニウムクロライド、メチレンブルー、インジゴトリスルホン酸、フェノサフラニン、チオニン、ニューメチレンブルー、2,6-ジクロ

ロフェノール、インドフェノール、アズレB、N、N、N'、N'-テトラメチル-p-フェニレンジアミンジヒドロクロリド、レゾルフィン、サフラニン、ソディウムアントラキノンβ-スルフォネート、インジゴカーミン等の色素、リボフラビン、L-アスコルビン酸、フラビンアデニンジヌクレオチド、フラビンモノヌクレオチド、ニコチンアデニンジヌクレオチド、ルミクロム、ユビキノ、ハイドロキノ、2、6-ジクロロベンゾキノ、2-メチルベンゾキノ、2、5-ジヒドロキシベンゾキノ、2-ヒドロキシ-1、4-ナフトキノ、グルタチオン、パーオキシダーゼ、チトクロムC、フェレドキシン等の生体酸化還元物質又はその誘導体、その他Fe-EDTA、Mn-EDTA、Zn-EDTA、メソスルフェート、2、3、5、6-テトラメチル-p-フェニレンジアミン、フェリシアン化カリウム等が挙げられる。これらのメディエータの濃度は、40nM以上程度が好ましい。

【0022】上記の化合物の中では、1-M-PMS、DCIP、フェリシアン化カリウム及び9-ジメチルアミノベンゾ-α-フェナゾキシニウムクロライドが好ましい。

【0023】BODの測定は、有機物を含有しない緩衝液を用いて対極若しくは参照電極と作用電極との間を流れる電流を測定し、続いて測定試料あるいは前記緩衝液で希釈した測定試料液を用いて同様に電流を測定し、これらの電流の差を、標準試料を用いたときの電流の差と比較することにより行う。

【0024】センサを流れる電流は、微生物の種類、金属電極と微生物膜との接触面積、メディエータの種類及び濃度、対極と金属電極との間に負荷する電位差、BOD濃度等に依存するので、これらは予備実験を行って適宜設定するとよい。

【0025】本発明のBODセンサを有機物含有溶液に浸漬すると、センサの微生物膜中の微生物により、有機物が代謝される。その結果、電子が電子伝達系に移動する。対極と金属電極との間に電位差を負荷すると、電子が微生物膜から金属電極に移行する。その結果、電子が発生しないと比べて得られる電流が異なる。この電流を計測することにより、有機物濃度、すなわちBODを測定することができる。

【0026】この際、試料溶液中又は微生物膜にメディエータを添加しておく、微生物から電子が金属電極に移行するのを促進するので、測定感度が向上する。

【0027】

【実施例】以下に、本発明の実施例を説明する。

【0028】

【実施例1】 BODセンサ

はじめに、BODセンサを構成する作用電極の一例、及びこの作用電極を有するBODセンサを用いた測定系を、図1、2に基づいて説明する。

【0029】活性汚泥からスクリーニングされたバチルス属に属する微生物(L-GL3と命名した)を、0.3%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.03%MgSO<sub>4</sub>・7H<sub>2</sub>O、0.5%硫酸アンモニウム、0.001%L-グルタミン酸、0.1%酵母エキスを含む培地80ml(pH7.0)に植菌し、30℃で48時間、振盪培養した。培養液を遠心して菌体と培地とを分離し、菌体を緩衝液(0.05Mリン酸pH7.0)で洗滌し、同緩衝液に懸濁させた。

10 【0030】上記で得られた菌懸濁液を多孔性アセチルセルロース膜1a(孔径0.45μm)で濾過し、膜面に菌体1bを付着させた。この膜1を微生物膜とし、テフロンチューブ8を被覆することにより側面を絶縁した直径3mmの円柱状の白金電極2の一方の端部に、膜の菌体1bが付着している面が接するように被せ、その上から透析膜1cで覆い、O-リング3で固定した(図1)。電極の他方の端部には、リード線4を銀ペーストで接着することにより結線した。リード線は、クリップ等を用いて金属電極に固定してもよい。上記リード線と金属電極との接続部位は、熱収縮チューブを被覆することにより絶縁した。金属電極の側面及びリード線との接続部位の絶縁は、以下の実施例においても上記と同様にして行った。

20 【0031】上記のように構成された作用電極20を用いて、以下のような測定系(3極法)(図2)によりBOD測定法の検討を行った。上記作用電極と参照電極5(Ag/AgCl電極)と対極(白金電極)7とをポテンシオスタット6に接続し、緩衝液を入れた試料槽9に浸漬し、BODセンサとした。参照電極と作用電極との間に定電圧を負荷し、流れる電流を計測した。次に、BOD標準液又はL-グルタミン酸溶液を添加し、同様に電流値を測定した。BODの測定中は、マグネチックスター10を用いて試料液を攪拌した。測定値は、レコーダ12で記録した。

【0032】

【実施例2】 至適電位の検討

上記測定系における至適負荷電位の検討を行った。試料液30を40nM DCIP、40nM 1-M-PMSを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)とし、これを5ml入れた試料槽中にBODセンサを挿入し、負荷電位を+200mV~1Vに設定し、一定濃度の有機物(150mg/l L-グルタミン酸)40μlを添加し、電流値の増加を測定した。結果を図3に示す。

【0033】この結果から、+200mV~800mVの間ではほぼ等しい応答値を示し、上記条件下においては、この範囲で測定するのが好ましいことがわかった。

【0034】

【実施例3】 緩衝液の至適濃度の検討

緩衝液濃度の検討を行った。リン酸緩衝液(pH7.0)の濃度を10mM~200mMの間で変化させ、負

荷電位を+400mVに固定した以外は実施例2と同様にして電流値の増加を測定した。結果を図4に示す。

【0035】この結果から、10mM~200mMのリン酸緩衝液(pH7.0)では等しい応答値を示し、少なくともこの範囲で測定できることがわかった。

【0036】

【実施例4】 至適メディエータ濃度の検討(1)

メディエータにDCIP及び1-M-PMSを用い、1-M-PMSが濃度40nMのときの至適DCIP濃度の検討を行った。リン酸緩衝液(pH7.0)の濃度を0.01Mとし、負荷電位を+400mVに固定し、DCIP濃度を10~80nMの間で変化させた以外は実施例2と同様にして電流値の増加を測定した。結果を図5に示す。DCIP濃度10nM以上で良い応答値が得られた。

【0037】

【実施例5】 至適メディエータ濃度の検討(2)

メディエータにDCIP及び1-M-PMSを用い、DCIP濃度が40nMのときの至適1-M-PMS濃度の検討を行った。DCIP濃度を40nMとし、1-M-PMS濃度を0~80nMの間で変化させた以外は実施例4と同様にして電流値の増加を計測した。結果を図6に示す。

【0038】この結果から10nM以上で良い応答値が得られることがわかる。

【0039】

【実施例6】 メディエータが電流値に与える影響の検討

0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)5ml中に、メディエータとして1-M-PMSのみ40nM、DCIPのみ40nM、あるいは1-M-PMS及びDCIPを各々40nMとなるように添加し、これらの緩衝液またはメディエータを添加していない緩衝液にBODセンサを挿入し、さらに、BOD標準液(グルコース及びL-グルタミン酸をそれぞれ150mg/l含む混合溶液(BOD220mg/l):以下、単に「BOD標準液」という)を加え、電流を測定した。結果を図7に示す。

【0040】高濃度のBOD標準溶液添加では、メディエータなしでも小さいながら電流値の増加が得られた。しかし、メディエータを添加した方が、大きい電流値の増加が得られた。従って、本センサは、メディエータなしでもBOD測定が可能であるが、メディエータを添加した方がより効果があることが示された。

【0041】

【実施例7】 BOD測定用検量線の作成

40nM DCIP、40nM 1-M-PMSを含む0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)を5ml入れた試料槽中に、BODセンサを挿入し、+400mVの電位を負荷し、BOD標準液を添加し、電流値の増加を測

定した。結果を図8に示す。

【0042】この結果から明らかなように、少なくとも1500mg/ml程度までは、電流値はBOD濃度に比例して増加し、本発明の方法により、BODを正確に測定できることがわかる。

【0043】

【実施例8】 溶存酸素の影響の検討

本発明の方法に溶存酸素が与える影響を調べた。0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)5ml中に、窒素、酸素、空気をそれぞれ30分間通気し、DCIP及び1-M-PMSを各々終濃度が40nMとなるように添加し、BODセンサを挿入し、+400mVの電位を負荷し、BOD標準液を40μl添加し、電流値の増加を測定した。同様に気体を通気せずに測定を行った。結果を図9に示す。

【0044】各種気体の通気の有無に関わらず、電流値は一定であり、本発明のBODセンサは、溶存酸素の影響を受けずにBODを測定できた。本発明のBODセンサは、従来のセンサのように、溶存酸素の減少量によりBODを測定するものではなく、有機物が代謝されることにより生じる電子を計測することによりBODを測定するものであることを支持するものである。

【0045】

【実施例9】 他のメディエータの検討

0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)5ml中に、1-M-PMSのみ(80nM)、フェリシアン化カリウム(8mM)あるいは9-ジメチルアミノベンゾ-α-フェナゾキソニウムクロライド(40nM)を添加し、BODセンサを挿入し、さらに、BOD標準液を加え、電流を測定した。結果を図10~12に示す。

【0046】

【実施例10】 電極素材についての検討

白金電極と同じく、径3mmの金、銀、カーボン電極を用いてBODセンサを作製し、実施例6と同様にBODの測定を行った。但し、参照電極を使用せず、作用電極と対極との間に電位差を負荷し、両電極間に流れる電流を測定した。結果を図13に示す。この結果から明らかなように、白金、金、銀、カーボン電極とも同様の結果が得られ、安定な金属あるいはカーボンの様な導電性の物質であれば測定可能であることがわかった。

【0047】

【実施例11】 微生物膜に用いる微生物の種類の検討

(1) エシエリヒア・コリ(Escherichia coli:大腸菌)  
エシエリヒア・コリ JM109を37℃で12時間振盪培養し、ニトロセルロース膜に固定化して、これをPt電極に装着した。得られた作用電極と対極と参照電極から構成されるBODセンサを、メディエータ(1-M-PMS、DCIP各40nM)を含む緩衝液中に挿入し、BOD標準液を添加し、上記と同様にして電流値の

増加を測定した。結果を図14に示す。

【0048】(2) バチルス・ステアロサーモフィルス  
(*Bacillus stearothermophilus*)

バチルス・ステアロサーモフィルス I AM 11602  
を45℃で振盪培養して同様の実験を行った。結果を図  
15に示す。

【0049】(3) アシネトバクター・カルコアセティ  
カス (*Acinetobacter calcoaceticus*)

アシネトバクター・カルコアセティカス I FO 125  
52を30℃で培養して同様の実験を行った。メディエ  
ータにはフェリシアン化カリウム(8 mM)を使用し  
た。結果を図16に示す。

【0050】(4) トリコスボロン・クタネウム (*Tric  
hosporon cutaneum*)

トリコスボロン・クタネウム I FO 10466を30  
℃で培養して同様の実験を行った。メディエータには1  
-M-PMS(80 nM)を使用した。結果を図17に  
示す。

【0051】(5) グルコノバクター・サブオキシダン  
ス (*Gluconobacter suboxydans*)

グルコノバクター・サブオキシダンス I FO 3172  
を30℃で培養して同様の実験を行った。メディエータ  
にはフェリシアン化カリウム(10 mM)を使用した。  
結果を図18に示す。

【0052】(6) シュードモナス・エルギノーサ (*Ps  
eudomanas aeruginosa*)

シュードモナス・エルギノーサ I FO 10466を3  
0℃で培養して同様の実験を行った。メディエータには  
フェリシアン化カリウム(8 mM)を使用した。結果を  
図19に示す。

【0053】以上の結果から、異なる種類の微生物を用  
いても、本発明の方法によりBODを測定できることが  
明らかである。

【0054】

【実施例12】 溶存酸素の低い溶液中でのBOD測定  
0.01 Mリン酸緩衝液に窒素ガスを30分間通気させ  
た後に、5 ml 緩衝液中に最終濃度40 nMになるよう  
にDCIP及び1-M-PMSを添加した。これに実施  
例1と同様のBODセンサを挿入し、+400 mVの電  
位差をかけ、BOD標準液を添加した。測定中、緩衝液  
中の溶存酸素のない状態又は低い状態を保つために液面  
に窒素ガスを吹き付けながら、電流値の増加を測定し  
た。

【0055】窒素ガスを吹き付けたものと、通常通り測  
定したものとではほぼ同様の結果を得た(図20)。よ  
って、本発明のBODセンサを用いることにより溶存酸  
素の低いあるいはない溶液でもBODの測定が可能であ  
ることが示された。

【0056】

【実施例13】 BODセンサの他の実施例

実施例1と同様にして培養して得られたL-G L 3株の  
菌体を、直径3 mmの円柱状の白金電極の金属面に、ア  
ガロース、光架橋性ポリビニルアルコール(PVA-S  
bQ: polyvinyl alcohol stilbazole quaternized) 又  
はグルタルアルデヒドを用いて固定化し、作用電極を作  
製した。これらの作用電極と、対極及び参照電極からな  
るBODセンサを用いて、BODの測定を行った。

【0057】(1) アガロース

アガロースを適当な濃度(例えば2%)となるように加  
熱溶解し、約60℃に保持しながら、これにL-G L 3  
菌体をリン酸緩衝液に懸濁させた懸濁液を混合した。こ  
うして得られた菌体を懸濁させたアガロース溶液を、直  
径3 mmの円柱状の白金電極の一方の端面に均一に付着  
させ、冷却し、作用電極とした。

【0058】この作用電極、対極及び参照電極を用い  
て、図1と同様の測定系によりBODの測定を行った。  
試料には前記BOD標準液を、メディエータには100  
nM 1-M-PMSを用いた。結果を図21に示す。

【0059】(2) PVA-SbQ

リン酸緩衝液に懸濁したL-G L 3懸濁液に、PVA-S  
bQ溶液を適量混合し、これを直径3 mmの円柱状の  
白金電極の金属面に均一に付着させ、37℃で3時間暗  
所でインキュベートした。その後、蛍光灯を照射し、P  
VA-SbQを架橋させた。

【0060】この作用電極を用いて、(1)と同様にし  
てBODの測定を行った。但し、メディエータには1 m  
Mフェリシアン化カリウムを用いた。結果を図22に示  
す。

【0061】(3) グルタルアルデヒド

リン酸緩衝液に懸濁したL-G L 3懸濁液にウシ血清ア  
ルブミン(BSA)を適量溶解させ、直径3 mmの円柱  
状の白金電極の金属面に均一に付着させた。これを、約  
25%濃度のグルタルアルデヒド水溶液の蒸気に20分  
曝した後、リン酸緩衝液で3回リンスした。

【0062】この作用電極を用いて、(1)と同様にし  
てBODの測定を行った。但し、メディエータには80  
nM 1-M-PMSを用いた。結果を図23に示す。  
以上の結果から、金属電極に菌体を固定化する方法にか  
かわらず、本発明のBODセンサを用いてBODを測定  
することができることが明らかである。

【0063】

【発明の効果】本発明のBODセンサを用いると、溶存  
酸素濃度に影響されることなく、BODを測定すること  
ができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明のBODセンサを構成する作用電極の  
一実施例を示す断面図。

【図2】 本発明のBODセンサを用いたBOD測定系  
の一例を示す正面図。

【図3】 負荷電圧と電流値との関係を示すグラフ図。

【図4】 緩衝液濃度と電流値との関係を示すグラフ図。

【図5】 メディエータ（DCIP）濃度と電流値との関係を示すグラフ図。

【図6】 メディエータ（1-M-PMS）濃度と電流値との関係を示すグラフ図。

【図7】 メディエータの種類を変えたときのBODと電流値との関係を示すグラフ図。

【図8】 BOD測定検量線の一例を示すグラフ図。

【図9】 溶存気体がBOD測定に与える影響を示すグラフ図。

【図10】 メディエータとして8 mMフェリシアン化カリウムを使用したときのBODと電流値との関係を示すグラフ図。

【図11】 メディエータとして40 nM 9-ジメチルアミノベンゾ- $\alpha$ -フェナゾキソニウムクロライドを使用したときのBODと電流値との関係を示すグラフ図。

【図12】 メディエータとして80 nM 1-M-PM Sを使用したときのBODと電流値との関係を示すグラフ図。

【図13】 電極素材を変えたときのBODと電流値との関係を示すグラフ図。

【図14】 微生物膜の微生物として大腸菌を用いたときBODと電流値との関係を示すグラフ図。

【図15】 微生物膜の微生物としてバチルス・ステアロサーモフィルスをを用いたときBODと電流値との関係を示すグラフ図。

【図16】 微生物膜の微生物としてアシネトバクター・カルコアセチカスを用いたときBODと電流値との関係を示すグラフ図。

【図17】 微生物膜の微生物としてトリコスボロン・クタネウムを用いたときBODと電流値との関係を示すグラフ図。

【図18】 微生物膜の微生物としてグルコノバクター・\*

\* サブオキシダンスを用いたときBODと電流値との関係を示すグラフ図。

【図19】 微生物膜の微生物としてシュードモナス・エルギノーサを用いたときBODと電流値との関係を示すグラフ図。

【図20】 低溶存酸素がBOD測定に与える影響を示すグラフ図。

【図21】 アガロースを用いて微生物菌体を金属電極に固定したBODセンサによるBODの測定を示す図。

【図22】 光架橋性ポリビニルアルコール（PVA-S b Q: polyvinyl alcohol stilbazole quaternized）を用いて微生物菌体を金属電極に固定したBODセンサによるBODの測定を示す図。

【図23】 グルタルアルデヒドを用いて微生物菌体を金属電極に固定したBODセンサによるBODの測定を示す図。

【符号の説明】

1 a. 多孔性アセチルセルロース膜

1 b. 菌体

1 c. 透析膜

2. 金属電極

3. O-リング

4. リード線

5. 参照電極

6. ポテンシオスタット

7. 対極

8. テフロンチューブ

9. 試料槽

10. マグネチックスターラ

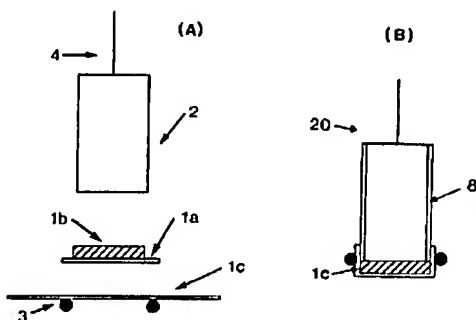
11. スターラバー

12. レコーダ

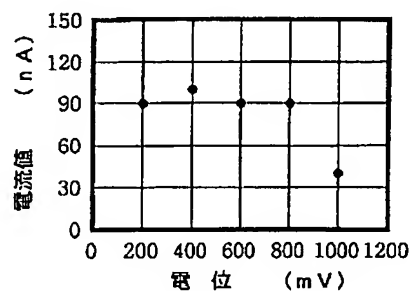
20. 作用電極

30. 測定試料液

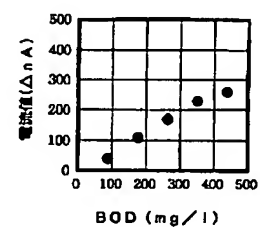
【図1】



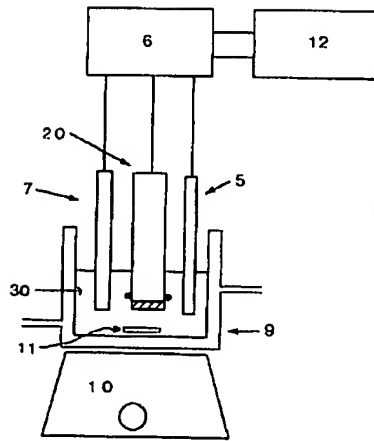
【図3】



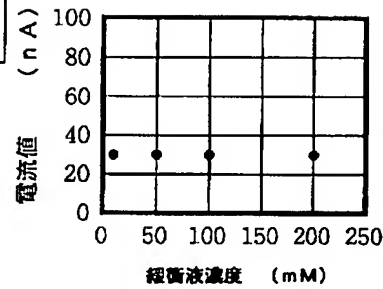
【図21】



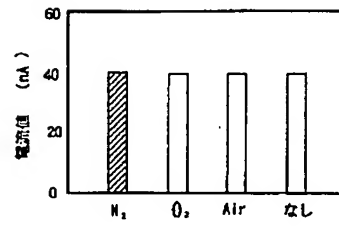
【図2】



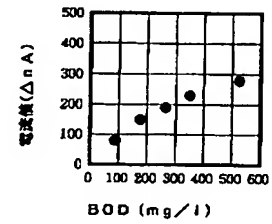
【図4】



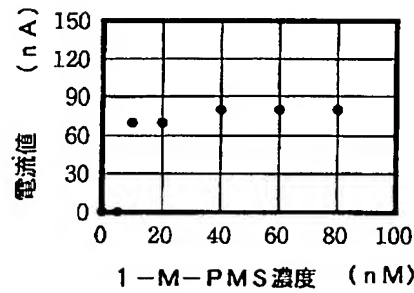
【図9】



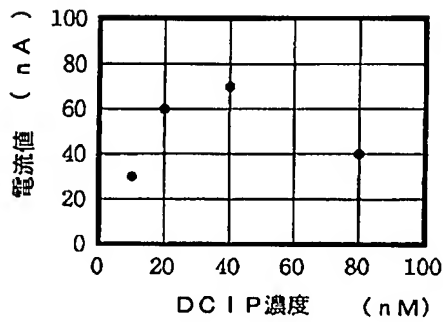
【図22】



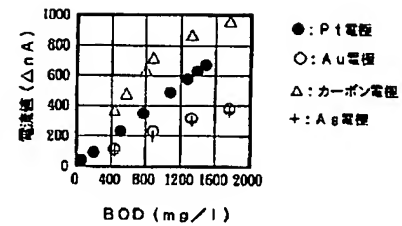
【図6】



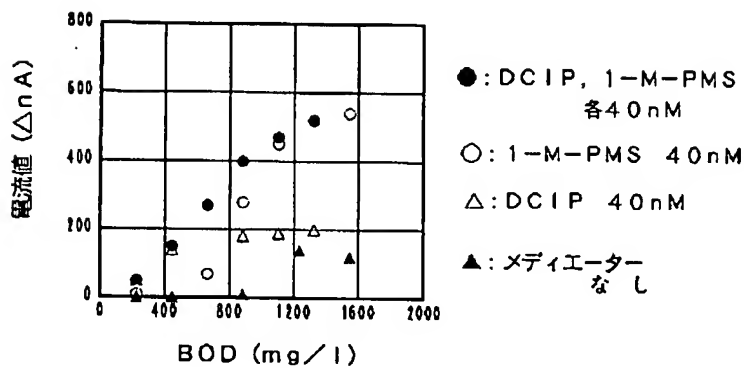
【図5】



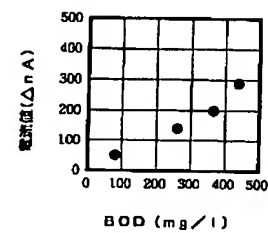
【図13】



【図7】

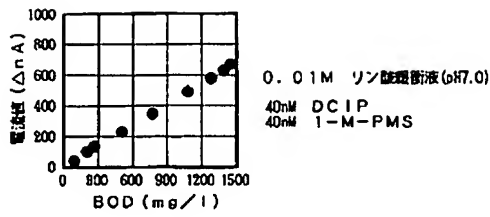


【図23】

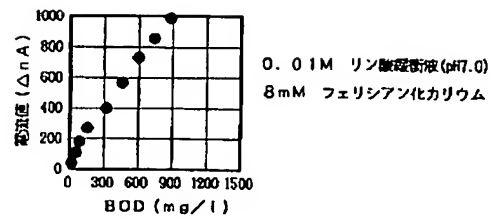




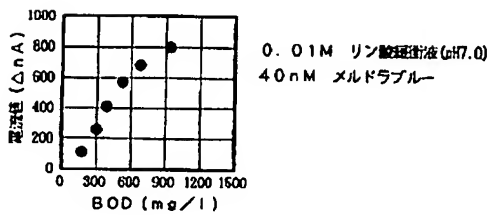
【図8】



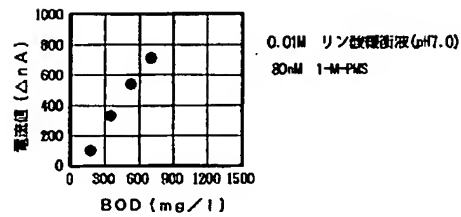
【図10】



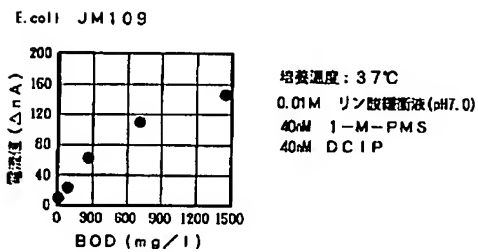
【図11】



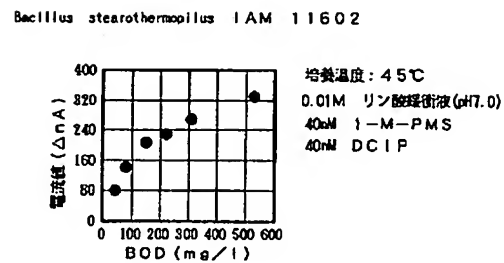
【図12】



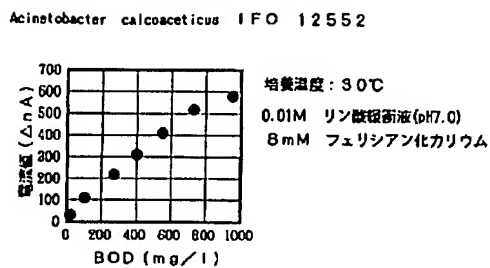
【図14】



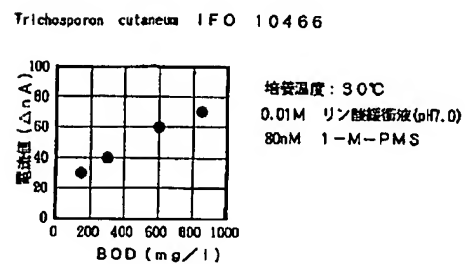
【図15】



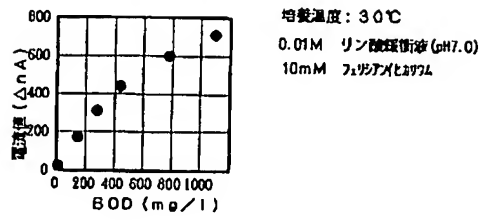
【図16】



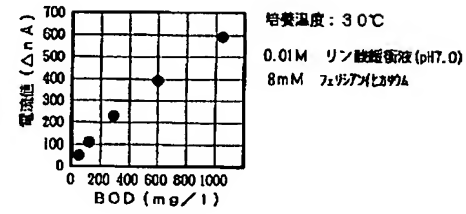
【図17】



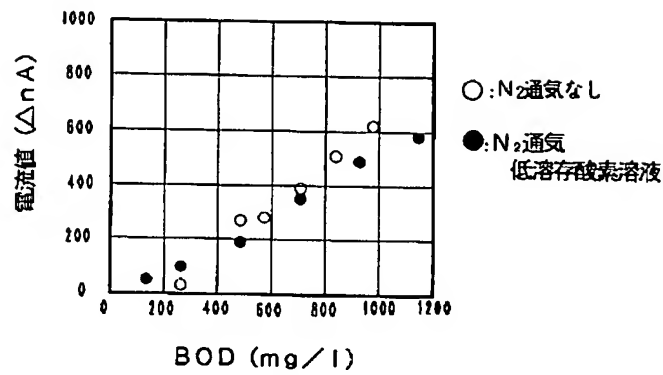
【図18】

*Gluconobacter suboxydans* IFO 3172

【図19】

*Pseudomonas aeruginosa* IFO 3080

【図20】



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-167824

(43)Date of publication of 04.07.1995  
application :

---

(51)Int.Cl.

G01N 27/327

G01N 27/416

G01N 33/18

---

(21)Application 06-202134 (71)Applic AKEBONO BRAKE RES & DEV  
number : ant : CENTER LTD

KARUBE MASAO

(22)Date of 26.08.199 (72)Invent KARUBE MASAO  
filing : 4 or : YANO KIYOKO

---

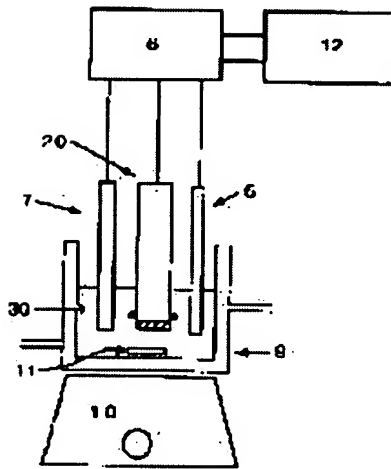
(30)Priorit

y

Priority 052119 Priorit 26.08.1 Priority JP  
number : 54 y date : 993 country :

---

(54) BOD SENSOR AND MEASURING METHOD OF BOD



(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a BOD sensor which enables measurement even when the amount of oxygen dissolved is lower by allowing direct measurement of the concentration of organic compounds without using any oxygen electrode.

CONSTITUTION: An electrode comprising metal or carbon, a working electrode 20 comprising a thin film containing a microorganism biomass abutting the electrode and a counter electrode 7 are immersed into a solution 30

containing organic matters and a reference electrode 5 is done so as required. Then, a current measured as flowing between both the electrodes when a potential difference is loaded between the working electrode 12 and the counter electrode 7 or the reference electrode 5 thereby determining BOD of the solution.

---

#### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 21.04.2000

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3304206

[Date of registration] 10.05.2002

[Number of appeal against  
examiner's decision of  
rejection]

[Date of requesting appeal  
against examiner's decision of  
rejection]

[Date of extinction of right]

#### CLAIMS

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The BOD sensor which has the microbial electrode which consists of a thin film containing the microorganism fungus body contacted by this electrode at the electrode list which consists of a metal or carbon, and a counter electrode.

[Claim 2] The BOD sensor according to claim 1 which furthermore has a reference electrode.

[Claim 3] The BOD sensor according to claim 1 or 2 characterized by said microorganism being prokaryote.

[Claim 4] How to measure BOD of this solution by measuring the current which flows between two electrodes when the working electrode and counter electrode which consist of a thin film containing the microorganism fungus body contacted by this electrode at the electrode list which becomes a solution containing the organic substance from a metal or carbon are immersed and the load of the potential difference is carried out between a working electrode and a counter electrode.

[Claim 5] How to measure BOD of this solution by measuring the current which flows between two electrodes when a reference electrode is further immersed in said solution and the load of the potential difference is carried out between a working electrode and a reference electrode in claim 4.

[Claim 6] How to measure BOD according to claim 4 or 5 characterized by said microorganism being prokaryote.

[Claim 7] How to measure BOD of a publication in any 1 term of

claims 4-6 characterized by adding a mediator on the solution and/or microorganism film containing said organic substance.

[Claim 8] said mediator -- 1-methoxy-5-methyl phenazinium methyl sulfonate, the 2, 6-dichloroindophenol, and potassium ferricyanide -- since -- the approach of measuring BOD according to claim 6 characterized by being chosen out of the becoming group.

[Claim 9] How to measure BOD according to claim 7 to which said mediator is characterized by being added by the density range 10nm or more.

---

#### DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the BOD sensor which does not use an oxygen electrode in detail about a BOD sensor.

[0002]

[Description of the Prior Art] As a river or an item important for water quality management of industrial wastewater, there is BOD (biochemical oxygen demand) and it considers as the index of international organic nature water pollution. By the oxidation reaction by aerobic bacteria, the water pollution resulting from an organic compound decreases, and is eliminated, and dissolved oxygen is consumed corresponding to the organic substance concentration. By measuring this consumed amount of oxygen, water pollution becomes clear. That is, BOD expresses organic compound concentration indirectly with the amount of oxygen.

[0003] Although the measuring method of BOD was prescribed by Japanese Industrial Standards JIS, this approach needed complicated actuation and had troubles, like measurement takes five days further. Then, the BOD measuring method in which quickness, simplicity, and an online inspection are possible

is demanded, the BOD sensor is already developed, and it is used for measurement of industrial liquid waste etc.

[0004] The BOD sensor currently used conventionally consists of microorganism film and an oxygen electrode, and measures BOD by the decrement of the dissolved oxygen in a solution. The microbial electrode (JP,54-47699,A) with which the microorganism which carries out utilization of the organic substance for it to the diaphragm of an oxygen electrode between wrap permeable membrane, and consumes oxygen as such a sensor was made to enclose is known.

[0005] However, by the sensor which measures BOD by the decrement of the above dissolved oxygen, measuring an exact value has the problem of being difficult, with the low waste fluid of dissolved oxygen. Moreover, since the electrolytic solution etc. was built in an electrode, a certain amount of magnitude was required for the structure of an oxygen electrode.

[0006]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention is made from the above-mentioned viewpoint, can measure organic compound concentration directly, without using an oxygen electrode, and even if the amount of dissolved oxygen is low, it makes it a technical problem to offer the BOD sensor which can be measured.

[0007]

[Means for Solving the Problem] this invention person considered the BOD sensor as the following configurations, in order to solve the above-mentioned technical problem. That is, this invention is a BOD sensor which has the working electrode (microbial electrode) which consists of a thin film containing the microorganism fungus body contacted by this electrode at the electrode list which consists of a metal or carbon, and a counter electrode. Moreover, the approach of measuring BOD of this solution is offered by measuring the current which flows when this invention is immersed in the sensor which has the working electrode (microbial electrode) which consists of a thin film containing the microorganism fungus body contacted

by this electrode at the electrode list which becomes a solution containing the organic substance from a metal or carbon, and a counter electrode and the load of the potential difference is carried out between a microbial electrode and a counter electrode.

[0008] Moreover, this invention explains this invention to a detail the following which offers the approach of measuring BOD of this solution by measuring the current which flows when this BOD sensor is immersed in the BOD sensor which has a reference electrode further in addition to the above-mentioned configuration, and the solution containing the organic substance and the load of the potential difference is carried out to them between a working electrode and a reference electrode.

[0009] The BOD sensor of BOD sensor this invention of <1> this invention has the working electrode which consists of a thin film (only henceforth the "microorganism film") containing the microorganism fungus body contacted by this metal electrode at the electrode (only henceforth "metal electrode") list which consists of a metal or carbon, and a counter electrode. The BOD sensor of other modes of this invention has a reference electrode further with the working electrode which consists of a thin film (only henceforth the "microorganism film") containing the microorganism fungus body contacted by this metal electrode at the metal-electrode list, and a counter electrode.

[0010] If a microorganism is made to exist in the sample solution containing an organic compound, a microorganism will be metabolized for energy acquisition of an organic compound. In the process, migration of an electron takes place to the electron transport system of a respiratory chain. Under the present circumstances, the organic substance concentration metabolized and the amount of the electron which moves have correlation. Therefore, by measuring the amount of this electron that moves, the organic substance concentration which exists in the surroundings of a microorganism can be known, and



BOD can be measured. Since it is difficult to measure the movement magnitude of this electron directly, in this invention, the load of the fixed potential difference is carried out so that it may be immersed in an organic compound content solution and an electron may tend to move the BOD sensor which has the above-mentioned configuration between the working electrode of a sensor, a counter electrode, or a reference electrode, and the current which flows between two electrodes is measured. Below, the configuration of the BOD sensor of this invention is explained.

[0011] The microorganism film is for making a microorganism fungus body exist in a metal-electrode front face or its near, and especially a gestalt will not be asked if it is a thin film-like thing. for example, a microorganism fungus body -- the three-dimensions structure of cross linkage, such as alginic-acid gel film, agarose gel film, optical cross-linking polyvinyl alcohol film, or polyacrylamide film, -- what was enclosed with the inside of the body is mentioned. A microorganism may be enclosed in the shape of film between a metal electrode and the film which does not make microorganism fungus bodies, such as permeable membrane, penetrate. Moreover, a microorganism fungus body may be fixed to a poly membrane. Furthermore, what used glutaraldehyde etc. for the metal membrane front face which constitutes a working electrode, and fixed the microorganism in the shape of film may be used. As for the microorganism in a thin film, surviving is desirable.

[0012] As the above-mentioned microorganism, it is not especially restricted to an electron transport system by metabolizing the organic substance that what is necessary is just that to which migration of an electron takes place. Although both a pronucleus microorganism and an eukaryon microorganism can be used, since electron transport of a respiratory chain is performed within a mitochondrion in eukaryote intracellular and there are comparatively few amounts of the electron which moves to a working electrode, in respect of BOD sensitometry, a pronucleus microorganism is

desirable. The yeast with which pronucleus microorganisms belonging to *Escherichia coli*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Gluconobacter*, or *Pseudomonas*, such as bacteria and an *Actinomyces*, belong to the *Trichosporon* as an eukaryon microorganism as a pronucleus microorganism, for example is mentioned.

[0013] The electrode which consists of a metal or carbon receives the electron which the organic substance in a BOD test portion is metabolized by the microorganism, and produces. Carbon materials, such as metals, such as platinum, gold, and silver, or graphite, and carbon, are mentioned that are stable, and conductivity is large as a material of a working electrode, and what is necessary is substantially harmless just to a microorganism. Moreover, as the configuration, although there is especially no limit, the shape of a cylinder, tubed, and a sheet is mentioned.

[0014] The working electrode which constitutes the BOD sensor of this invention makes the microorganism film contact the above-mentioned metal electrode. If the distance of a metal electrode and the microorganism film separates too much, the electron produced by the microorganism film cannot move to a metal electrode. In this semantics, it does not necessarily need to be completely in contact with "contact", and the electron should be just close to movable extent in a solution.

[0015] Permeable membrane is put on what fixed the microorganism through the functional group as concrete structure of the above-mentioned working electrode on the metal-electrode front face, the thing which pasted up the gel film containing a microorganism on the metal electrode, and a metal-electrode edge, and what put in the microorganism between a metal electrode and permeable membrane is mentioned. Moreover, a metal electrode may be covered, as suction filtration of the microorganism suspension is carried out on thin films, such as an acetyl cellulose, the harvest of the microorganism is carried out to the shape of film on this thin film and it covers by permeable membrane from the outside of acetylcellulose

membrane. Moreover, the configuration of a metal electrode and the configuration of the microorganism film are good to make it these touch areas become large.

[0016] The BOD sensor of this invention has the above-mentioned working electrode and a counter electrode, and has a reference electrode further if needed. Platinum, silver, gold, carbon, etc. are mentioned as a material of a counter electrode. The concentration of the reaction kind in an electrode surface may shift from the potential which decreased, and the concentration of a product increased and electrode potential set up as electrode reaction advances, when a BOD sensor is immersed in test portion liquid and the load of the potential difference is carried out between a working electrode and a counter electrode. Then, it is desirable for reference electrodes, such as an Ag/AgCl electrode, to be immersed in a sample solution, and to set up the potential of a working electrode as criteria of a potential setup of a reference electrode (3 pole method).

[0017] The BOD sensor of this invention is good also considering a reference electrode as another object a working electrode, a counter electrode, and if needed, and good also as integral construction.

[0018] The measuring method of BOD of measurement Homoto invention of <2> BOD is the approach of measuring BOD of this solution by measuring the current which flows between two electrodes, when the above-mentioned BOD sensor is immersed in the solution (test portion liquid) containing the organic substance and the load of the potential difference is carried out between a working electrode, a counter electrode, or a reference electrode.

[0019] Specifically the above-mentioned BOD sensor is immersed in test portion liquid, the load of the potential difference is carried out between a working electrode and a counter electrode, and the current which flows between two electrodes is measured. Moreover, in 3 pole method, the load of the potential difference is carried out between a working electrode and a reference electrode, and the current which flows between

two electrodes is measured. The load of the potential difference and measurement of a current are good to use a potentiostat etc.

[0020] Moreover, if the mediator is added to the sample solution, since high sensitivity measurement will be attained, it is desirable. Or a mediator may be included between the microorganism film and the metal electrode in the microorganism film.

[0021] A mediator promotes that the electron which the organic substance is metabolized by the microorganism and produced shifts to a metal electrode. As a mediator, that an electron shifts to a metal electrode from a microorganism that what is necessary is just what is promoted Specifically 1-methoxy-5-methyl phenazinium methyl sulfonate (1-M-PMS), The 2, 6-dichloroindophenol (DCIP), 9-dimethylamino benzo-alpha-FENAZOKISONIUMU chloride, A methylene blue, an indigo tris RUHON acid, phenosafranine, the thionine, A new methylene blue, 2, 6-dichlorophenol, an indophenol, AZURE B, N, and N, N', N'-tetramethyl-p-phenylene diamine dihydrochloride, A REZORU fin, a safranine, sodium anthraquinone beta-sulfonate, Coloring matter, such as indigo carmine, a riboflavin, L-ascorbic acid, flavin adenine dinucleotide, Flavin mononucleotide, nicotine adenine dinucleotide, lumichrome, Ubiquinone, hydroquinone, 2, 6-dichloro benzoquinone, 2-methyl benzoquinone, 2, 5-dihydroxy benzoquinone, 2-hydroxy-1,4-naphthoquinone, A biological oxidation reducing substance or its derivatives, such as a glutathione, a par oxidase, cytochrome C, and ferredoxin, In addition, Fe-EDTA, Mn-EDTA, Zn-EDTA, meso sulfate, 2, 3 and 5, 6-tetramethyl-p-phenylene diamine, potassium ferricyanide, etc. are mentioned. The concentration of these mediators has desirable 40 or more nMs extent.

[0022] In the above-mentioned compound, 1-M-PMS, DCIP, potassium ferricyanide, and 9-dimethylamino benzo-alpha-FENAZOKISONIUMU chloride are desirable.

[0023] Measurement of BOD measures a current similarly using

the test portion liquid which measured, and diluted with a test portion or said buffer solution continuously the current which flows between a counter electrode or a reference electrode, and working electrodes using the buffer solution which does not contain the organic substance, and is performed by comparing the difference of these currents with the difference of the current when using a standard sample.

[0024] Since the flowing current depends for a sensor on the potential difference, BOD concentration, etc. which carry out a load between the class of microorganism, the touch area of a metal electrode and the microorganism film, the class of mediator and concentration, a counter electrode, and a metal electrode, these are good to conduct preliminary experiment and to set up suitably.

[0025] The organic substance will be metabolized by the microorganism in the microorganism film of a sensor if the BOD sensor of this invention is immersed in an organic substance content solution. Consequently, an electron moves to an electron transport system. If the load of the potential difference is carried out between a counter electrode and a metal electrode, an electron will shift to a metal electrode from the microorganism film. Consequently, the currents acquired compared with the time of an electron not being generated differ. Organic substance concentration, i.e., BOD, can be measured by measuring this current.

[0026] Under the present circumstances, if the mediator is added on the inside of the sample solution, or the microorganism film, since it will promote that an electron shifts to a metal electrode from a microorganism, sensitometry improves.

[0027]

[Example] Below, the example of this invention is explained.

[0028]

[Example 1] The system of measurement using the BOD sensor which has an example of the working electrode which constitutes a BOD sensor, and this working electrode at the beginning of a BOD sensor is explained based on drawing 1 and 2.

[0029] Inoculation of the microorganism (it was named L-GL3) belonging to Bacillus screened from active sludge was carried out to 0.3%K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.03%MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5% ammonium sulfate, 0.001% L-glutamic acid, and 80ml (pH7.0) of culture media which contain a yeast extract 0.1%, and it carried out shaking culture at 30 degrees C for 48 hours. Centrifugal [ of the culture medium ] was carried out, the fungus body and the culture medium were separated, the buffer solution (0.05M phosphoric-acid pH7.0) washed the fungus body, and this buffer solution was made to suspend.

[0030] The bacillus suspension obtained above was filtered by porous acetylcellulose membrane 1a (0.45 micrometers of apertures), and fungus body 1b was made to adhere to a film surface. This film 1 was used as the microorganism film, and by covering the Teflon tube 8, one [ which insulated the side face ] edge of the platinum electrode 2 of the shape of a cylinder with a diameter of 3mm was covered so that the field where membranous fungus body 1b has adhered might touch, and it covered at it by permeable membrane 1c from on that, and fixed to it with O ring 3 ( drawing 1 ). In the other-end section of an electrode, it connected by pasting up lead wire 4 with a silver paste. Lead wire may be fixed to a metal electrode using a clip etc. The connection part of the above-mentioned lead wire and a metal electrode was insulated by covering heat-shrinkable tubing. The insulation of the side face of a metal electrode and a connection part with lead wire was performed like the above also in the following examples.

[0031] The following system of measurement (3 pole method) ( drawing 2 ) examined the BOD measuring method using the working electrode 20 constituted as mentioned above. The above-mentioned working electrode, the reference electrode 5 (Ag/AgCl electrode), and the counter electrode (platinum electrode) 7 were connected to the potentiostat 6, and it was immersed in the sample tub 9 which put in the buffer solution, and considered as the BOD sensor. The load of the constant voltage was carried out between the reference electrode and the

working electrode, and the flowing current was measured. Next, the BOD standard solution or a L-glutamic acid solution was added, and the current value was measured similarly. During measurement of BOD, the sample solution was agitated using the magnetic stirrer 10. Measured value was recorded by the recorder 12.

[0032]

[Example 2] Optimum load potential in the examination above-mentioned system of measurement of optimum potential was examined. the sample solution 30 was used as the 0.01M phosphate buffer solution (pH7.0) containing 40nM DCIP and 40nM 1-M-PMS, the BOD sensor was inserted into the sample tub which put this in 5ml, load potential was set as +200mV-1V, 40micro (150 mg/l L-glutamic acid) of organic substance 1 of fixed concentration was added, and the increment in a current value was measured. A result is shown in drawing 3 .

[0033] It turned out that it is desirable for an almost equal response value to be shown among +200mV - 800mV, and to measure in this range under the above-mentioned condition from this result.

[0034]

[Example 3] Examination buffer-solution concentration of the optimum concentration of the buffer solution was examined. The concentration of a phosphate buffer solution (pH7.0) was changed between 10mM-200mM(s), and the increment in a current value was measured like the example 2 except having fixed load potential to +400mV. A result is shown in drawing 4 .

[0035] This result showed that an equal response value was shown and it could measure in this range at least in the phosphate buffer solution (pH7.0) of 10mM-200mM.

[0036]

[Example 4] Examination of optimum mediator concentration (1) DCIP and 1-M-PMS were used for the mediator, and optimum DCIP concentration in case 1-M-PMS is concentration 40nM was examined. Concentration of a phosphate buffer solution (pH7.0) was set to 0.01M, load potential was fixed to +400mV, and the

increment in a current value was measured like the example 2 except having changed DCIP concentration between 10-80nM(s). A result is shown in drawing 5 . The good response value was acquired by 10 or more nMs of DCIP concentration.

[0037]

[Example 5] Examination of optimum mediator concentration (2) DCIP and 1-M-PMS were used for the mediator, and optimum 1-M-PMS concentration in case DCIP concentration is 40nM(s) was examined. DCIP concentration was set to 40nM(s) and the increment in a current value was measured like the example 4 except having changed 1-M-PMS concentration between 0-80nM(s). A result is shown in drawing 6 .

[0038] This result shows that a good response value is acquired by 10 or more nMs.

[0039]

[Example 6] In 5ml (pH7.0) of examination 0.01M phosphate buffer solutions of the effect which a mediator has on a current value As a mediator only 1-M-PMS 40nM(s), DCIP chisel 40nM, Or 1-M-PMS and DCIP are added so that it may be respectively set to 40nM(s). A BOD sensor is inserted in the buffer solution which has not added these buffer solutions or mediators. Furthermore, the BOD standard solution (the mixed solution which contains a glucose and L-glutamic acid 150 mg/l, respectively (BOD220 mg/l): only henceforth the "BOD standard solution") was added, and the current was measured. A result is shown in drawing 7 .

[0040] In high-concentration BOD standard solution addition, though it was small even when he had no mediator, the increment in a current value was acquired. However, the increment in a current value with larger adding a mediator was acquired. Therefore, although BOD measurement was possible even when this sensor had no mediator, it was shown that the direction which added the mediator is more effective.

[0041]

[Example 7] The BOD sensor was inserted into the sample tub which put in 5ml (pH7.0) of 0.01M phosphate buffer solutions



containing creation 40nM DCIP of the calibration curve for BOD measurement, and 40nM 1-M-PMS, the load of the potential of +400mV was carried out, the BOD standard solution was added, and the increment in a current value was measured. A result is shown in drawing 8 .

[0042] A current value increases to ml in proportion to BOD concentration in about at least 1500mg /, and the approach of this invention shows that BOD can be measured correctly so that clearly from this result.

[0043]

[Example 8] The effect which dissolved oxygen has on the approach of examination this invention of the effect of dissolved oxygen was investigated. Into 5ml (pH7.0) of 0.01M phosphate buffer solutions, aeration of nitrogen, oxygen, and the air was carried out for 30 minutes, respectively, DCIP and 1-M-PMS were added so that final concentration might serve as 40nM(s) respectively, the BOD sensor was inserted, the load of the potential of +400mV was carried out, 40microl addition of the BOD standard solution was done, and the increment in a current value was measured. It measured without carrying out aeration of the gas similarly. A result is shown in drawing 9 .

[0044] It was not concerned with the existence of the aeration of various gases, but the current value is fixed and the BOD sensor of this invention has measured BOD, without being influenced of dissolved oxygen. The BOD sensor of this invention supports that it is what does not measure BOD by the decrement of dissolved oxygen and measures BOD like the conventional sensor by measuring the electron produced by metabolizing the organic substance.

[0045]

[Example 9] In 5ml (pH7.0) of examination 0.01M phosphate buffer solutions of other mediators, (80nM), potassium ferricyanide (8mM), or 9-dimethylamino benzo-alpha-FENAZOKISONIUMU chloride (40nM) was added, the BOD sensor was inserted, and further, only 1-M-PMS added the BOD standard solution, and measured the current. A result is shown

in drawing 10 -12.

[0046]

[Example 10] As well as the examination platinum electrode about an electrode material, the BOD sensor was produced using gold of 3mm of diameters, silver, and a carbon electrode, and BOD was measured like the example 6. However, a reference electrode was not used, but the load of the potential difference was carried out between the working electrode and the counter electrode, and the current which flows between two electrodes was measured. A result is shown in drawing 13 . The same result also as platinum, gold, silver, and a carbon electrode was obtained, and when it was conductive matter like a stable metal or carbon, it turned out that it is measurable, so that clearly from this result.

[0047]

[Example 11] Examination (1) *Escherichia coli* of the class of microorganism used for the microorganism film (*Escherichia coli*: *Escherichia coli*)

*Escherichia coli* Shaking culture of JM109 was carried out at 37 degrees C for 12 hours, it fixed in the nitrocellulose membrane, and Pt electrode was equipped with this. The BOD sensor which consists of the working electrode and counter electrode which were obtained, and a reference electrode was inserted into the buffer solution containing a mediator (DCIP 1-M-PMS, 40 nM(s) each), the BOD standard solution was added, and the increment in a current value was measured like the above. A result is shown in drawing 14 .

[0048] (2) *Bacillus SUTEARO thermophilus* (*Bacillus stearothermophilus*)

*Bacillus SUTEARO.thermophilus* Shaking culture of IAM11602 was carried out at 45 degrees C, and the same experiment was conducted. A result is shown in drawing 15 .

[0049] (3) The *Acinetobacter cull core ceti dregs* (*Acinitobacter calcoaceticus*)

The *Acinetobacter cull core ceti dregs* IF012552 was cultivated at 30 degrees C, and the same experiment was conducted.

Potassium ferricyanide (8mM) was used for the mediator. A result is shown in drawing 16 .

[0050] (4) Trichosporon KUTANEUMU (Trichosporon cutaneum)  
Trichosporon KUTANEUMU IFO10466 was cultivated at 30 degrees C, and the same experiment was conducted. 1-M-PMS (80nM) was used for the mediator. A result is shown in drawing 17 .

[0051] (5) Gluconobacter suboxydans (Gluconobacter suboxydans)

Gluconobacter suboxydans IFO3172 was cultivated at 30 degrees C, and the same experiment was conducted. Potassium ferricyanide (10mM) was used for the mediator. A result is shown in drawing 18 .

[0052] (6) Pseudomonas ERUGI norther (Pseudomonas aeruginosa)  
The Pseudomonas ERUGI norther IFO10466 was cultivated at 30 degrees C, and the same experiment was conducted. Potassium ferricyanide (8mM) was used for the mediator. A result is shown in drawing 19 .

[0053] Even if it uses the microorganism of a different class from the above result, it is clear that BOD can be measured by the approach of this invention.

[0054]

[Example 12] After carrying out aeration of the nitrogen gas to the BOD measurement 0.01M phosphate buffer solution in the inside of the low solution of dissolved oxygen for 30 minutes, DCIP and 1-M-PMS were added so that it might be set to last concentration 40nM into 5ml buffer solution. The same BOD sensor as an example 1 was inserted in this, the +400mV potential difference was applied, and the BOD standard solution was added. The increment in a current value was measured spraying nitrogen gas on an oil level, in order to maintain a condition or a low condition without the dissolved oxygen in measurement and the buffer solution.

[0055] The almost same result was obtained by what sprayed nitrogen gas, and the measured thing which usually passed along ( drawing 20 ). therefore, dissolved oxygen is low by using the BOD sensor of this invention -- it is -- it is -- it was shown

by the solution which is not that measurement of BOD is possible.

[0056]

[Example 13] In the metal side of the platinum electrode of the shape of a cylinder with a diameter of 3mm, agarose, optical cross-linking polyvinyl alcohol (PVA-SbQ:polyvinyl alcohol stilbazole quaternized), or glutaraldehyde was used, the fungus body of three shares of L-GL which cultivated like other example examples 1 of a BOD sensor, and was obtained was fixed, and the working electrode was produced. BOD was measured using the BOD sensor which consists of these working electrodes, and a counter electrode and a reference electrode.

[0057] (1) The suspension which made this suspend L-GL3 fungus body in a phosphate buffer solution was mixed, holding [ carried out the heating dissolution of the agarose agarose so that it might become suitable concentration (for example, 2%), and ] at about 60 degrees C. In this way, homogeneity was made to adhere to one end face of the platinum electrode of the shape of a cylinder with a diameter of 3mm, it cooled, and the agarose solution which made the obtained fungus body suspend was used as the working electrode.

[0058] BOD was measured according to the same system of measurement as drawing 1 using this working electrode, the counter electrode, and the reference electrode. Said BOD standard solution was used for the sample, and 100nM(s)1-M-PMS was used for the mediator. A result is shown in drawing 21 .

[0059] (2) To L-GL3 suspension suspended in the PVA-SbQ phosphate buffer solution, carried out optimum dose mixing of the PVA-SbQ solution, this was made to adhere to homogeneity in the metal side of the platinum electrode of the shape of a cylinder with a diameter of 3mm, and it incubated at 37 degrees C in the dark place for 3 hours. Then, the fluorescent lamp was irradiated and PVA-SbQ was made to construct a bridge.

[0060] BOD was measured like (1) using this working electrode. However, 1mM potassium ferricyanide was used for the mediator. A result is shown in drawing 22 .

[0061] (3) The optimum dose dissolution of the bovine serum

albumin (BSA) was carried out, and homogeneity was made to adhere to L-GL3 suspension suspended in the glutaraldehyde phosphate buffer solution in the metal side of the platinum electrode of the shape of a cylinder with a diameter of 3mm. After putting this to the steam of the glutaraldehyde water solution of concentration about 25% for 20 minutes, the rinse of it was carried out 3 times with the phosphate buffer solution. [0062] BOD was measured like (1) using this working electrode. However, 80nM(s) 1-M-PMS was used for the mediator. A result is shown in drawing 23 . It is clear to a metal electrode from the above result that BOD can be measured using the BOD sensor of this invention irrespective of the approach of fixing a fungus body.

[0063]

[Effect of the Invention] BOD can be measured without being influenced by dissolved oxygen concentration if the BOD sensor of this invention is used.

#### DESCRIPTION OF DRAWINGS

---

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] The sectional view showing one example of the working electrode which constitutes the BOD sensor of this invention.

[Drawing 2] The front view showing an example of BOD system of measurement using the BOD sensor of this invention.

[Drawing 3] The graphical representation showing the relation between a load electrical potential difference and a current value.

[Drawing 4] The graphical representation showing the relation between buffer-solution concentration and a current value.

[Drawing 5] The graphical representation showing the relation between mediator (DCIP) concentration and a current value.

[Drawing 6] The graphical representation showing the relation between mediator (1-M-PMS) concentration and a current value.

[Drawing 7] The graphical representation showing the relation

between BOD when changing the class of mediator, and a current value.

[Drawing 8] The graphical representation showing an example of a BOD measurement calibration curve.

[Drawing 9] The graphical representation showing the effect which a dissolved gas has on BOD measurement.

[Drawing 10] The graphical representation showing the relation between BOD when using 8mM potassium ferricyanide as a mediator, and a current value.

[Drawing 11] The graphical representation showing the relation between BOD when using 40nM(s) 9-dimethylamino benzo-alpha-FENAZOKISONIUMU chloride as a mediator, and a current value.

[Drawing 12] The graphical representation showing the relation between BOD when using 80nM(s) 1-M-PMS as a mediator, and a current value.

[Drawing 13] The graphical representation showing the relation between BOD when changing an electrode material, and a current value.

[Drawing 14] The graphical representation showing the relation between BOD and a current value when *Escherichia coli* is used as a microorganism of the microorganism film.

[Drawing 15] The graphical representation showing the relation between BOD and a current value when *Bacillus SUTEARO thermophilus* is used as a microorganism of the microorganism film.

[Drawing 16] The graphical representation showing the relation between BOD and a current value when the *Acinetobacter cull core ceti dregs* are used as a microorganism of the microorganism film.

[Drawing 17] The graphical representation showing the relation between BOD and a current value when *Trichosporon KUTANEUMU* is used as a microorganism of the microorganism film.

[Drawing 18] The graphical representation showing the relation between BOD and a current value when *Gluconobacter suboxydans* is used as a microorganism of the microorganism film.

[Drawing 19] The graphical representation showing the relation

between BOD and a current value when the Pseudomonas ERUGI norther is used as a microorganism of the microorganism film.

[Drawing 20] The graphical representation showing the effect which low dissolved oxygen has on BOD measurement.

[Drawing 21] Drawing showing measurement of BOD by the BOD sensor which fixed the microorganism fungus body to the metal electrode using agarose.

[Drawing 22] Drawing showing measurement of BOD by the BOD sensor which fixed the microorganism fungus body to the metal electrode using optical cross-linking polyvinyl alcohol (PVA-SbQ:polyvinyl alcohol stilbazole quaternized).

[Drawing 23] Drawing showing measurement of BOD by the BOD sensor which fixed the microorganism fungus body to the metal electrode using glutaraldehyde.

[Description of Notations]

1a. Porous acetylcellulose membrane

1b. Fungus body

1c. Permeable membrane

2. Metal Electrode

3. O ring

4. Lead wire

5. Reference electrode

6. Potentiostat

7. Counter Electrode

8. Teflon Tube

9. Sample Tub

10. Magnetic Stirrer

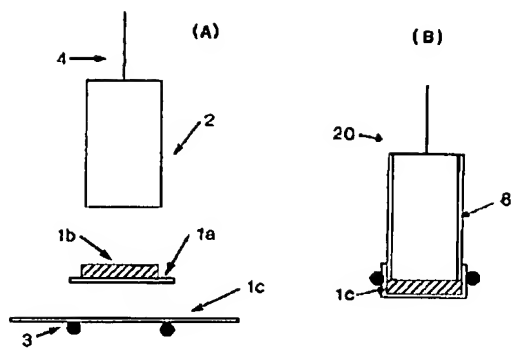
11. Star Rubber

12. Recorder

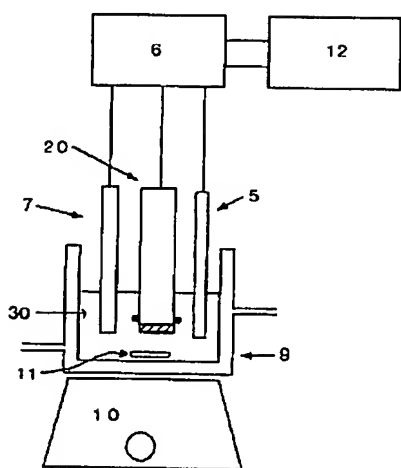
20. Working Electrode

30. Test Portion Liquid

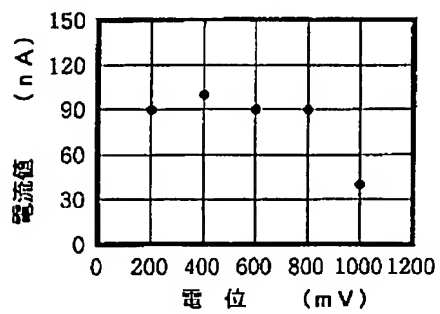
Drawing 1



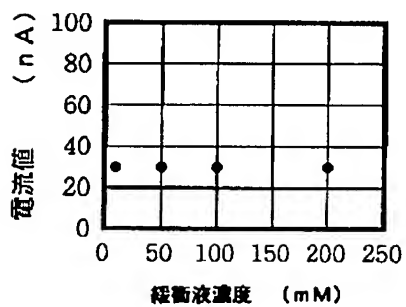
Drawing 2



Drawing 3

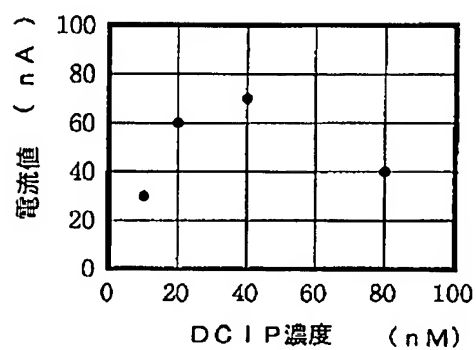


Drawing 4

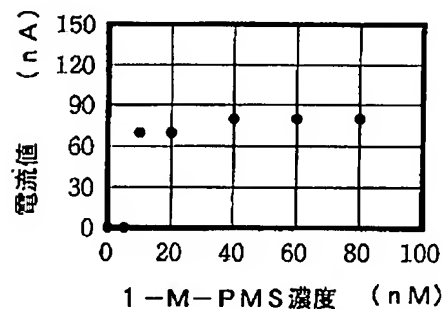




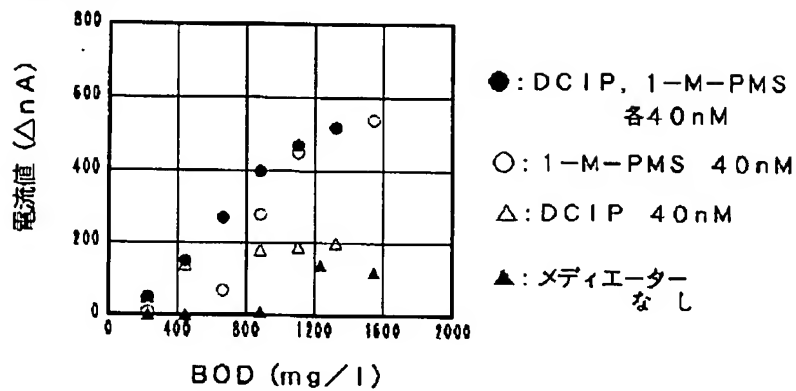
Drawing 5



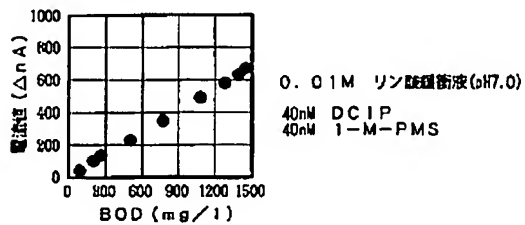
Drawing 6



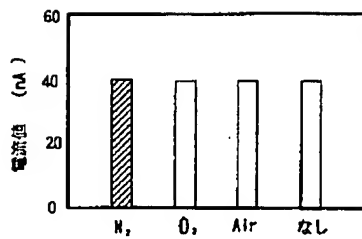
Drawing 7



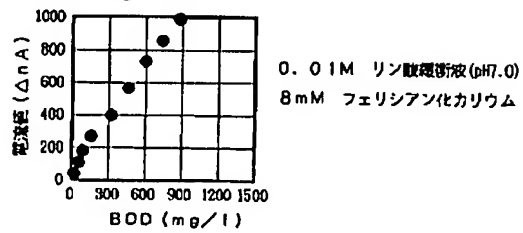
Drawing 8



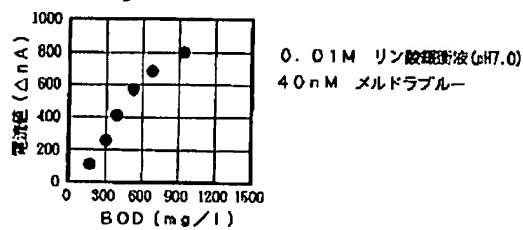
Drawing 9



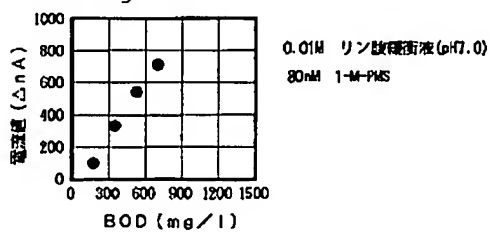
Drawing 10



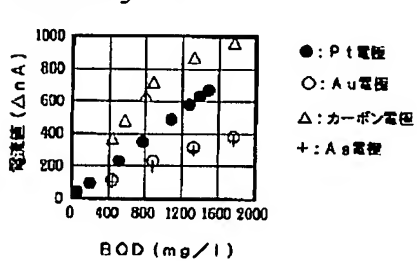
Drawing 11



Drawing 12

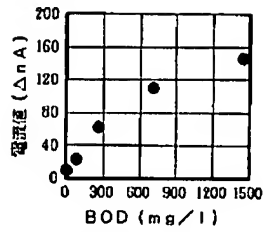


Drawing 13



Drawing 14

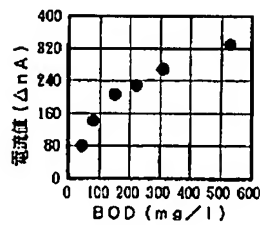
*E. coli* JM109



培養温度: 37℃  
0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0)  
40μM 1-M-PMS  
40μM DCIP

Drawing 15

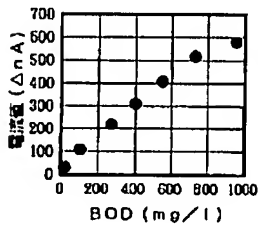
*Bacillus stearothermophilus* IAM 11602



培養温度: 45℃  
0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0)  
40μM 1-M-PMS  
40μM DCIP

Drawing 16

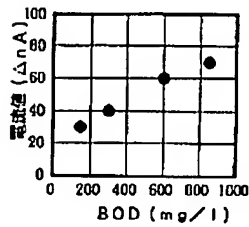
*Acinetobacter calcoaceticus* IFO 12552



培養温度: 30℃  
0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0)  
8mM フェリシアン化カリウム

Drawing 17

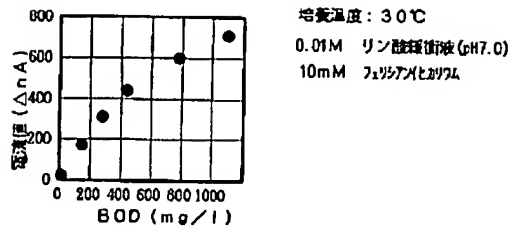
*Trichosporon cutaneum* IFO 10466



培養温度: 30℃  
0.01M リン酸緩衝液 (pH7.0)  
80μM 1-M-PMS

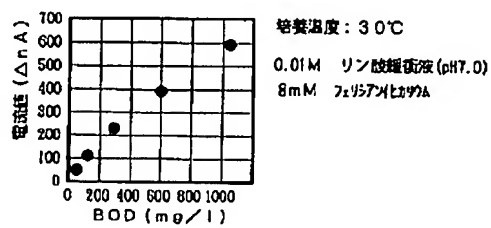
Drawing 18

*Gluconobacter suboxydans* IFO 3172

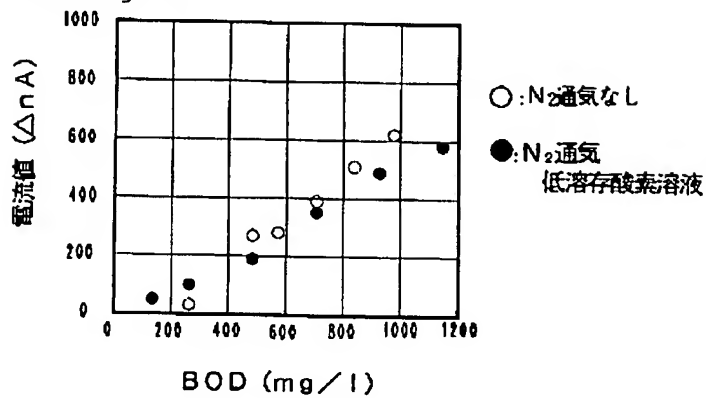


Drawing 19

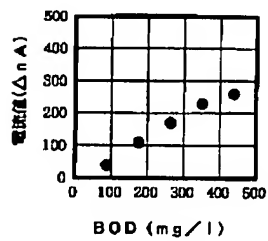
*Pseudomonas aeruginosa* IFO 3080



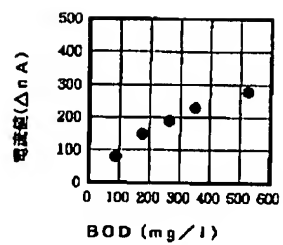
Drawing 20



Drawing 21



Drawing 22



Drawing 23

